

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

# PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 01 April 1999 (01.04.99)	
International application No.: PCT/EP98/06065	Applicant's or agent's file reference: 17150P WO
International filing date: 23 September 1998 (23.09.98)	Priority date: 23 September 1997 (23.09.97)
Applicant: TSCHÖPE, Michael et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:  
16 December 1998 (16.12.98)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer:</p> <p>J. Zahra</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

To:

WEICKMANN, H.  
Kopernikusstrasse 9  
D-81679 München  
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 12 May 1999 (12.05.99)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 17150P WO	
International application No. PCT/EP98/06065	International filing date (day/month/year) 23 September 1998 (23.09.98)

## 1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant
 ☐ the inventor
 ☐ the agent
 ☐ the common representative

## Name and Address

DR. RENTSCHLER BIOTECHNOLOGIE GMBH  
& CO. KG  
Erwin-Rentschler-Strasse 21  
D-88471 Laupheim  
Germany

## State of Nationality

DE

## State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

## 2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person
 ☒ the name
 ☐ the address
 ☐ the nationality
 ☐ the residence

## Name and Address

RENTSCHLER BIOTECHNOLOGIE GMBH &  
CO. KG  
Erwin-Rentschler-Strasse 21  
D-88471 Laupheim  
Germany

## State of Nationality

DE

## State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

## 3. Further observations, if necessary:

## 4. A copy of this notification has been sent to:

<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Kari Huynh-Khuong

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

# PATENT COOPERATION TREATY

PCT/EP98/06065

**PCT**

## NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

WEICKMANN, H.  
Kopernikusstrasse 9  
D-81679 München  
ALLEMAGNE



<b>Date of mailing (day/month/year)</b> 20 November 1998 (20.11.98)	<b>Applicant's or agent's file reference</b> 17150P WO
<b>International application No.</b> PCT/EP98/06065	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
<b>International filing date (day/month/year)</b> 23 September 1998 (23.09.98)	<b>International filing date (day/month/year)</b> 23 September 1998 (23.09.98)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant
 ☒ the inventor
 ☐ the agent
 ☐ the common representative

Name and Address

HOFER, Hans  
Beim Käppele 11  
D-88487 Walpertshofen  
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person
 ☐ the name
 ☐ the address
 ☐ the nationality
 ☐ the residence

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

**The applicant/inventor identified above should now be added to the records as applicant/inventor for the US only.**

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
 ☐ the designated Offices concerned  
☒ the International Searching Authority
 ☐ the elected Offices concerned  
☐ the International Preliminary Examining Authority
 ☐ other:

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colmbettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35.

Authorized officer

*S. Baharlou*  
S. Baharlou

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

# PCT

## ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

23. Sep. 1998

Vom Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Internationales Anmeldedatum

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)  
(max. 12 Zeichen)

17150P WO

### Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Flüssige Interferon- $\beta$  Formulierungen

### Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Dr. Rentschler Biotechnologie GmbH  
Erwin-Rentschler-Straße 21  
D-88471 Laupheim  
DE

☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☒ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

### Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Tschöpe, Michael  
Kastanienweg 72  
D-88400 Biberach  
DE

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☒ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

### Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als: ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Weickmann H., Weickmann F.A., Huber B.,  
Liska H., Prechtel J., Böhm B., Weiß W.,  
Tiesmeyer J., Herzog M.  
Kopernikusstraße 9/81679 München -DE

Telefonnr.:

089/ 455 63-0

Telefaxnr.:

089/ 470 50 68

Fernschreibnr.:

522 621 wepat d

☐ Zustellanschrift: Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

<b>Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER</b>	
<i>Wird keines der folgenden Felder benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigelegt werden.</i>	
<p><small>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</small></p> <p><b>Siklosi, Thomas</b>  <b>Alpenweg 15</b>  <b>D-88487 Walpertshofen</b>  <b>DE</b></p>	<p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p>
Staatsangehörigkeit (Staat): <b>DE</b>	Sitz oder Wohnsitz (Staat): <b>DE</b>
<p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p>	
<p><small>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</small></p> <p><b>Schroeder, Peter</b>  <b>Hopfenweg 17</b>  <b>D-88471 Laupheim</b>  <b>DE</b></p>	<p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p>
Staatsangehörigkeit (Staat): <b>DE</b>	Sitz oder Wohnsitz (Staat): <b>DE</b>
<p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p>	
<p><small>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</small></p>	<p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p>
Staatsangehörigkeit (Staat):	Sitz oder Wohnsitz (Staat):
<p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p>	
<p><small>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</small></p>	<p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p>
Staatsangehörigkeit (Staat):	Sitz oder Wohnsitz (Staat):
<p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p>	
<p><input type="checkbox"/> Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.</p>	

Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- ☐ AP ARIPO-Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☐ EA Eurasisches Patent: AM Armenien, AZ Aserbaidshan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ EP Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☐ OA OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

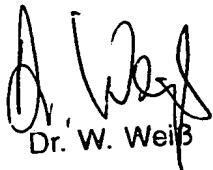
Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- |                                                               |                                                                             |
|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> AL Albanien                          | <input type="checkbox"/> LS Lesotho                                         |
| <input type="checkbox"/> AM Armenien                          | <input type="checkbox"/> LT Litauen                                         |
| <input type="checkbox"/> AT Österreich                        | <input type="checkbox"/> LU Luxemburg                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien             | <input type="checkbox"/> LV Lettland                                        |
| <input type="checkbox"/> AZ Aserbaidshan                      | <input type="checkbox"/> MD Republik Moldau                                 |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina               | <input type="checkbox"/> MG Madagaskar                                      |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados                          | <input type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarien                         | <input type="checkbox"/> MN Mongolei                                        |
| <input type="checkbox"/> BR Brasilien                         | <input type="checkbox"/> MW Malawi                                          |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus                           | <input type="checkbox"/> MX Mexiko                                          |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada                 | <input type="checkbox"/> NO Norwegen                                        |
| <input type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein  | <input type="checkbox"/> NZ Neuseeland                                      |
| <input type="checkbox"/> CN China                             | <input type="checkbox"/> PL Polen                                           |
| <input type="checkbox"/> CU Kuba                              | <input type="checkbox"/> PT Portugal                                        |
| <input type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik             | <input type="checkbox"/> RO Rumänien                                        |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland                       | <input type="checkbox"/> RU Russische Föderation                            |
| <input type="checkbox"/> DK Dänemark                          | <input type="checkbox"/> SD Sudan                                           |
| <input type="checkbox"/> EE Estland                           | <input type="checkbox"/> SE Schweden                                        |
| <input type="checkbox"/> ES Spanien                           | <input type="checkbox"/> SG Singapur                                        |
| <input type="checkbox"/> FI Finnland                          | <input type="checkbox"/> SI Slowenien                                       |
| <input type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich            | <input type="checkbox"/> SK Slowakei                                        |
| <input type="checkbox"/> GE Georgien                          | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone                                    |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana                             | <input type="checkbox"/> TJ Tadschikistan                                   |
| <input type="checkbox"/> GM Gambia                            | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan                                    |
| <input type="checkbox"/> GW Guinea-Bissau                     | <input type="checkbox"/> TR Türkei                                          |
| <input type="checkbox"/> HR Kroatien                          | <input type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago                             |
| <input type="checkbox"/> HU Ungarn                            | <input type="checkbox"/> UA Ukraine                                         |
| <input type="checkbox"/> ID Indonesien                        | <input type="checkbox"/> UG Uganda                                          |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel                 | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika       |
| <input type="checkbox"/> IS Island                            |                                                                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan                  | <input type="checkbox"/> UZ Usbekistan                                      |
| <input type="checkbox"/> KE Kenia                             | <input type="checkbox"/> VN Vietnam                                         |
| <input type="checkbox"/> KG Kirgisistan                       | <input type="checkbox"/> YU Jugoslawien                                     |
| <input type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | <input type="checkbox"/> ZW Simbabwe                                        |
| <input type="checkbox"/>                                      |                                                                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea         |                                                                             |
| <input type="checkbox"/> KZ Kasachstan                        |                                                                             |
| <input type="checkbox"/> LC Saint Lucia                       |                                                                             |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka                         |                                                                             |
| <input type="checkbox"/> LR Liberia                           |                                                                             |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:

- ☐ GD Grenada
- ☐

Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen: Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

<b>Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH</b>		<input type="checkbox"/> Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben.		
Anmeldedatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen der früheren Anmeldung	Ist die frühere Anmeldung eine:		
		nationale Anmeldung: Staat	regionale Anmeldung: regionales Amt	internationale Anmeldung: Anmeldeamt
Zeile (1) 23.09.1997	97 116 562.6		EP (ben. St. u.a. DE)	
Zeile (2)				
Zeile (3)				
<input type="checkbox"/> Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in der (den) Zeile(n) bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist(sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist)				
<i>* Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, so muß in dem Zusatzfeld mindestens ein Staat angegeben werden, der Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung eingereicht wurde.</i>				
<b>Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE</b>				
Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA) (falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörden für die Ausführung der internationalen Recherche zuständig sind, geben Sie die von ihnen gewählte Behörde an; der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden)		Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche; Bezugnahme auf diese frühere Recherche (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist):		
ISA /		Datum (Tag/Monat/Jahr)      Aktenzeichen      Staat (oder regionales Amt)		
<b>Feld Nr. VIII KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE</b>				
Diese internationale Anmeldung enthält die folgende Anzahl von Blättern:		Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:		
Antrag : 4 Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil) : 33 Ansprüche : 5 Zusammenfassung : 1 Zeichnungen : Sequenzprotokollteil der Beschreibung : 6 Blattzahl insgesamt : 49		1. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung 2. <input type="checkbox"/> Gesonderte unterzeichnete Vollmacht 3. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden): 4. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen einer Unterschrift 5. <input checked="" type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer gekennzeichnet: 6. <input type="checkbox"/> Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache: 7. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material 8. <input checked="" type="checkbox"/> Protokoll der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzen in computerlesbarer Form 9. <input type="checkbox"/> Sonstige (einzeln auflisten):		
Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.):		Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird: deutsch		
<b>Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS</b>				
Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.				
23. Sep. 1998				
 Dr. W. Weiß				

Vom Anmeldeamt auszufüllen	
1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	2. Zeichnungen <input type="checkbox"/> eingegangen:  <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	
5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind): ISA /	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben

Vom Internationalen Büro auszufüllen	
Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:	



Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

6

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 17150P WO	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/4J6)	
International application No. PCT/EP98/06065	International filing date (day/month/year) 23 September 1998 (23.09.98)	Priority date (day/month/year) 23 September 1997 (23.09.97)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 38/21, 9/08		
Applicant RENTSCHLER BIOTECHNOLOGIE GMBH & CO. KG		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.  <input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  These annexes consist of a total of <u>3</u> sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:  I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 16 December 1998 (16.12.98)	Date of completion of this report 24 January 2000 (24.01.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP  Facsimile No.	Authorized officer  Telephone No.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP98/06065

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-33, as originally filed,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the claims, Nos. 4--22, 24, as originally filed,  
 Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 Nos. 1, 3, 23, 25, 26, filed with the letter of 06 October 1999 (06.10.1999),  
 Nos. 2, filed with the letter of 20 December 1999 (20.12.1999).
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_, as originally filed,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/EP 98/06065

**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

The sequence protocol pages 1-6 were also filed originally. The amended Claims 1-3, 23, 25-26 do not contravene PCT Article 19(2), nor does the amended Claim 2 filed again on 20.12.1999.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 98/06065

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	3, 8, 10, 15-17, 23	YES
	Claims	1-2, 4-7, 9, 11-14, 18-22, 24-26	NO
Inventive step (IS)	Claims	3, 8, 10, 15-17	YES
	Claims	1-2, 4-7, 9, 11-14, 18-26	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-26	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

#### 1. The following documents are referred to:

- D1 EP-A-0 529 300 (BIOFERON BIOCHEMISCHE SUBSTANZEN GMBH & CO) 3 March 1993 mentioned in the application
- D2 US-A-5 358 708 (S.T. PATEL) 25 October 1994 mentioned in the application

#### 2. D1 discloses the following features of the claims (the references in parentheses refer to this document):

A preparation with liquid formulations of recombinant IFN- $\beta$  without stabilising additives, said preparation being set by a buffer to a pH value of 7.5 and having a high level of stability (yield 90-97%) when stored at 25°C after 4 weeks (Example 3, pages 7-8); IFN- $\beta$  is "usually ...  $1 \times 10^6$  to  $50 \times 10^6$  I.E./ml active ingredient solution" (page 5, line 26); "the pH value (is) ... preferably in the neutral range, i.e. in a range from approximately 4 to approximately 8" (page 5, lines 4-6). The only possible additives are fillers, preferably serum proteins such as HSA or other fillers such as PVP (page 5, lines 10-11). The cited Example 3 differs

from the subject matter of Claim 1 in that the concentration of IFN- $\beta$  is 30 to 70 x 10<sup>6</sup> I.E./ml. D1 also does not contain anything concrete to suggest a formulation with a concentration below 25 x 10<sup>6</sup> I.E./ml which does not contain any HSA. On the other hand the range 1 x 10<sup>6</sup> to 50 x 10<sup>6</sup> I.E./ml active ingredient solution is clearly defined and the use of PVP instead of HSA is given as the filler. Consequently, it is clear that only PVP could be used and Claim 1 is thus anticipated with respect to novelty.

If the teaching of D1 is therefore considered as a whole, HSA does not have to be present (also given Example 3). Moreover, the examples in an application are never delimiting and merely explain.

The subject matter of Claim 2 contains a restriction of the pH value to 6 up to 7.2. In this case there is a choice of a pH value range from a larger known range of 4-8. This range can only be recognised as being novel if the following criteria are met. Firstly, a narrow selected range has to be involved which is not close to points already disclosed in the known range. Moreover, there has to be a different technical effect for the narrow range. In the case of the range 6-7.2 it has to be established that no other technical effect can be recognised. Although, it is maintained that in this range in particular there is a higher level of stability of the formulations, the examples indicate the opposite. Example 1 (pages 12-17) can be mentioned in which the formulation 1 (pH 5.0) can be compared to the formulation 5 (pH 7.0) and would have to have a lower level of stability, but this is not the case. Example 2 (pages 17-19) can also be mentioned

in which the only difference between the formulations 7 and 10 is the pH value (7: pH 5.0; 10: pH 6.5). Consequently, no. 10 should be more stable in the long term, which is not the case (cf. for example, table 6, dose strength 3 after 3 months' storage). Consequently, Claim 2 cannot be recognised as being novel either.

The subject matter of the dependent Claims 4-7, 9, 11-14, 18-20 and Claims 21, 22, 24-26 which refer to pharmaceutical preparations or processes for preparing these preparations or for improving the life of liquid IFN- $\beta$  formulations is also not novel (cf. the report of 23.7.1999).

The subject matter of Claims 1-2, 4-7, 9, 11-14, 18-22 and 24-26 therefore does not meet the criterion stipulated in PCT Article 33(2).

3. The stability of liquid interferon- $\beta$  preparations above the storage period is considered to be the technical problem of the present application, the intention being to avoid risk-containing auxiliaries and maintain physiological pH values.

Claim 3 relates to liquid IFN- $\beta$  formulations which contain (in addition to amino acids with the exception of acidic amino acids, arginine or glycine) and consequently the long-term stability of their biological activity is at least 80%.

D2 discloses liquid formulations containing, for example, interferon whose storage stability is increased by adding methionine, histidine or mixtures thereof (Claims 1-12). This is interferon- $\alpha$  which has a certain structural relationship with IFN- $\beta$  but cannot be directly compared with it.

Moreover, after 2 weeks' storage at 40°C, activity of substantially above 80% is established (Example 1, Figure 1) but this cannot be used to draw clear conclusions about the activity at 25°C after 3 months.

Consequently, the solution proposed in Claims 3, 8, 10, 15-17 appears to be inventive in relation to D1 and D2 (PCT Article 33(3)).

Claim 23 of the present application refers to the provision of the preparation in individual tins which is part of standard pharmaceutical practice and therefore does not involve inventive activity.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP98/06065

## VI. Certain documents cited

### 1. Certain published documents (Rule 70.10)

<u>Application No. Patent No.</u>	<u>Publication date (day/month/year)</u>	<u>Filing date (day/month/year)</u>	<u>Priority date (valid claim) (day/month/year)</u>
WO98 28007 A	02 July 1998 (02.07.1998)	23 December 1997 (23.12.1997)	24 December 1996 (24.12.1996)

### 2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

<u>Kind of non-written disclosure</u>	<u>Date of non-written disclosure (day/month/year)</u>	<u>Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)</u>




# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 17150P WO/WWkh	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/06065	internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 23/09/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 23/09/1997
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61K38/21		
Anmelder RENTSCHLER BIOTECHNOLOGIE GMBH & CO. KG et al.		
<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragt Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt 3 Blätter.</p>		
<p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts</li><li>II <input type="checkbox"/> Priorität</li><li>III <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit</li><li>IV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung</li><li>V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung</li><li>VI <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen</li><li>VII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung</li><li>VIII <input type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung</li></ul>		
Datum der Einreichung des Antrags  16/12/1998	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  24.01.99	
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Markopoulos, E  Tel. Nr. +49 89 2399 8658	



# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/06065

## I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

### Beschreibung, Seiten:

1-33 ursprüngliche Fassung

### Patentansprüche, Nr.:

4-22,24 ursprüngliche Fassung

1,3,23,25,26 eingegangen am 06/10/1999 mit Schreiben vom 06/10/1999

2 eingegangen am 20/12/1999 mit Schreiben vom 20/12/1999

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:  
☐ Ansprüche, Nr.:  
☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

**siehe Beiblatt**

## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

### 1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	3, 8, 10, 15-17, 23
	Nein: Ansprüche	1-2, 4-7, 9, 11-14, 18-22, 24-26
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	3, 8, 10, 15-17
	N in: Ansprüche	1-2, 4-7, 9, 11-14, 18-26
Gewerblich Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-26
	Nein: Ansprüche	-

**2. Unterlagen und Erklärungen**

**siehe Beiblatt**

**VI. Bestimmte angeführte Unterlagen**

**1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)**

**und / oder**

**2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)**

**siehe Beiblatt**

### **Zu Punkt I**

Die Sequenzprotokollseiten 1-6 wurden ebenfalls ursprünglich eingereicht.

In Bezug zu den geänderten Ansprüchen 1-3, 23, 25-26 kein Verstoß gegenüber Artikel 19(2) PCT, auch nicht in Bezug zum nochmals am 20.12.1999 eingereichten geänderten Anspruch 2.

### **Zu Punkt V**

**Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

1. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: EP-A-0 529 300 (BIOFERON BIOCHEMISCHE SUBSTANZEN GMBH & CO)  
3. März 1993 in der Anmeldung erwähnt

D2: US-A-5 358 708 (S.T. PATEL) 25. Oktober 1994 in der Anmeldung erwähnt

2. Das Dokument D1 offenbart die folgenden Merkmale der Ansprüche (die Verweise in Klammern beziehen sich auf dieses Dokument):

Eine Zubereitung mit rekombinantem IFN- $\beta$  in flüssiger Formulierung ohne stabilisierende Zusätze, die mit einem Puffer auf pH 7,5 eingestellt wird und eine hohe Stabilität (Ausbeute 90-97%) bei einer Lagerung bei 25°C nach 4 Wochen aufweist (Bsp. 3, S. 7-8); IFN- $\beta$  beträgt "üblicherweise ...  $1 \times 10^6$  bis  $50 \times 10^6$  I.E./ml Wirkstofflösung" (S. 5, Z. 26); "der pH-Wert (liegt)... bevorzugt im neutralen Bereich, d.h. in einem Bereich von etwa 4 bis etwa 8" (S. 5, Z. 4-6). Die einzig möglichen Zusätze sind Füllstoffe, und zwar bevorzugt Serumproteine wie HSA oder andere Füllstoffe wie PVP (S. 5, Z. 10-11). Das zitierte Beispiel 3 unterscheidet sich vom Gegenstand des Anspruches 1 insoweit, daß die Konzentration von IFN- $\beta$  30 bzw.  $70 \times 10^6$  I.E./ml beträgt, auch findet sich in D1 kein konkreter Hinweis auf eine Formulierung mit einer Konzentration unter  $25 \times 10^6$  I.E./ml, die kein HSA enthält; auf der anderen Seite ist der Bereich  $1 \times 10^6$  bis  $50 \times 10^6$  I.E./ml Wirkstofflösung eindeutig definiert und die Verwendung von PVP statt HSA als Füllstoff angegeben, sodaß man ohne weiteres auch nur PVP verwenden könnte und Anspruch 1 somit neuheitsschädlich trifft.

Wenn man die Lehre aus D1 daher im Ganzen betrachtet, ist die Anwesenheit von HSA nicht zwingend (auch im Lichte von Beispiel 3). Desweiteren sind die Beispiele in einer

Patentanmeldung nie einschränkend und dienen lediglich der Erläuterung.

Der Gegenstand des Anspruches 2 enthält eine Einschränkung des pH-Wertes auf 6 bis 7,2. In diesem Fall liegt eine Auswahl eines pH-Wert-Bereiches aus einem größeren, bekannten Bereich von 4-8 vor. Solch ein Bereich kann nur als neu anerkannt werden, wenn folgende Kriterien erfüllt sind: erstens muß es sich um einen engen ausgewählten Bereich handeln, welcher nicht nahe von bereits offenbarten Punkten im bekannten Bereich liegt, weiters muß ein unterschiedlicher technischer Effekt für den engen Bereich vorliegen. Im Falle des Bereiches 6-7,2 muß festgestellt werden, daß kein anderer technischer Effekt zu erkennen ist. Es wird zwar einerseits behauptet, daß gerade in diesem Bereich eine höhere Stabilität der Formulierungen vorherrscht, aus den Beispielen ist aber das Gegenteil ablesbar. Zu erwähnen ist Beispiel 1 (S. 12 - 17), in dem die Formulierung 1 (pH 5,0) vergleichbar Formulierung 5 (pH 7,0) ist und eine geringere Stabilität aufweisen müßte, was aber nicht der Fall ist, und Beispiel 2 (S. 17 - 19), in dem sich die Formulierungen 7 und 10 nur im pH-Wert unterscheiden (7: pH 5,0; 10: pH 6,5) und demnach Nr. 10 eine eindeutig größere Langzeitstabilität haben sollte, was aber auf keinen Fall zutrifft (s. z.B. Tab. 6, Dosisstärke 3 nach einer Lagerung von 3 Monaten). Daher kann auch Anspruch 2 nicht als neu anerkannt werden.

Der Gegenstand der abhängigen Ansprüche 4-7, 9, 11-14, 18-20 und der Ansprüche 21, 22, 24-26, welche sich auf pharmazeutische Präparate oder Verfahren zur Herstellung dieser Präparate bzw. Verbesserung der Haltbarkeit flüssiger IFN- $\beta$ -Formulierungen beziehen, ist ebenfalls nicht neu (s. Bescheid vom 23. 7. 1999).

Der Gegenstand der Ansprüche 1-2, 4-7, 9, 11-14, 18-22 und 24-26 erfüllt damit nicht das in Artikel 33(2) PCT genannte Kriterium.

3. Als technisches Problem der vorliegenden Anmeldung wird die Stabilität von flüssigen Interferon- $\beta$  Präparaten über den Lagerzeitraum angesehen, wobei auf risikobehaftete Hilfsstoffe verzichtet und physiologische pH-Werte eingehalten werden sollen.

Anspruch 3 richtet sich auf flüssige IFN- $\beta$ -Formulierungen, die zusätzlich Aminosäuren ausgenommen saure Aminosäuren, Arginin oder Glycin enthalten und dadurch eine Langzeitstabilität der biologischen Aktivität von mindestens 80% besitzen.

Aus D2 sind flüssige Formulierungen enthaltend beispielsweise Interferon, deren Lagerungsstabilität durch Zusatz von Methionin, Histidin oder Mischungen davon erhöht

wird (Ansprüche 1-12), bekannt. Es handelt sich hierbei um Interferon- $\alpha$ , das eine gewisse strukturelle Verwandtschaft zu IFN- $\beta$  besitzt, aber nicht direkt damit vergleichbar ist. Desweiteren wird nach einer Lagerung von 2 Wochen bei 40°C eine Aktivität von etwas über 80% festgestellt (Beisp. 1, Abb. 1), woraus keine eindeutigen Schlüsse auf die Aktivität bei 25°C nach 3 Monaten gezogen werden können.

Daher erscheint die in den Ansprüchen 3, 8, 10, 15-17 vorgeschlagene Lösung erfinderisch gegenüber D1 und D2 zu sein (Artikel 33(3) PCT).

Anspruch 23 der vorliegenden Anmeldung bezieht sich auf die Bereitstellung des Präparates in Einzeldosen, was zur üblichen pharmazeutischen Praxis gehört und daher keiner erfinderischen Tätigkeit bedarf.

## **Zu Punkt VI**

### **Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)**

Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

Anmelde Nr. Patent Nr.	Veröffentlichungsdatum (Tag/Monat/Jahr)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Prioritätsdatum (zu Recht beansprucht) (Tag/Monat/Jahr)
WO 98 28007 A	2. Juli 1998	23. Dez. 1997	24. Dez. 1996

6.6 Okt. 1993

- 1 -

PCT/EP98/06065  
17150P WO  
Anlage

5

### Patentansprüche

10

15

1. Flüssige Formulierung, die humanes Interferon- $\beta$  als Wirkstoff in einer Konzentration bis zu 25 MU/ml und einen Puffer zur Einstellung eines pH-Werts von 5 bis 8 enthält, frei von Humanserumalbumin ist und nach Lagerung für 3 Monate bei 25°C eine Langzeitstabilität der biologischen in vitro Aktivität von mindestens 80% der Ausgangsaktivität aufweist, mit der Maßgabe, daß die Formulierung keine sauren Aminosäuren, Arginin oder Glycin in einem Gewichtsanteil zwischen 0,3 bis 5% enthält.

20

~~X Flüssige Formulierung, die humanes Interferon- $\beta$  als Wirkstoff und einen Puffer zur Einstellung eines pH-Werts von 6 bis 7,2 enthält, frei von Humanserumalbumin ist und nach Lagerung für 3 Monate bei 25°C eine Langzeitstabilität der biologischen in vitro Aktivität von mindestens 80% der Ausgangsaktivität aufweist, mit der Maßgabe, daß die Formulierung keine sauren Aminosäuren, Arginin oder Glycin in einem Gewichtsanteil zwischen 0,3 bis 5% enthält.~~

25

30

3. Flüssige Formulierung, die humanes Interferon- $\beta$  als Wirkstoff, einen Puffer zur Einstellung eines pH-Werts von 5 bis 8 und eine oder mehrere Aminosäuren enthält und nach Lagerung für 3 Monate bei 25°C eine Langzeitstabilität der biologischen in vitro Aktivität von mindestens 80% der Ausgangsaktivität aufweist, mit der Maßgabe, daß die Formulierung keine sauren Aminosäuren, Arginin oder Glycin in einem Gewichtsanteil zwischen 0,3 bis 5% enthält.

GEÄNDERTES BLATT

23. Pharmazeutisches Präparat nach Anspruch 21 oder 22 in Form von Einzeldosen von 1 bis 25 MU.

5 25. Verfahren zur Verbesserung der Haltbarkeit einer flüssigen Formulierung, die humanes Interferon- $\beta$  als Wirkstoff und einen Puffer zur Einstellung eines pH-Werts von 5 bis 8 enthält,

**dadurch gekennzeichnet,**

10 daß man eine Formulierung ohne Humanserumalbumin oder/und mit einer oder mehreren Aminosäuren verwendet, mit der Maßgabe, daß die Formulierung keine sauren Aminosäuren, Arginin oder Glycin in einem Gewichtsanteil zwischen 0,3 bis 5% enthält.

26. Verfahren nach Anspruch 25,

**dadurch gekennzeichnet,**

15 daß die Verbesserung der Haltbarkeit eine Verbesserung der Langzeitstabilität der biologischen in vitro Aktivität, der chemischen Integrität oder/und der physikalischen Integrität umfaßt.

20

vo-5. Oktober 1999



Neuer Anspruch 2

5

2. Flüssige Formulierung nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet,

10 daß sie einen Puffer zur Einstellung eines pH-Werts von 6 bis 7,2  
enthält.

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>A61K 38/21, 9/08</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/15193</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 1. April 1999 (01.04.99)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP98/06065 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 23. September 1998 (23.09.98)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 97116562.6      23. September 1997 (23.09.97)      EP  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> DR. RENTSCHLER BIOTECHNOLOGIE GMBH [DE/DE]; Erwin-Rentschler-Strasse 21, D-88471 Laupheim (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> TSCHÖPE, Michael [DE/DE]; Kastanienweg 72, D-88400 Biberach (DE). SIKLOSI, Thomas [DE/DE]; Alpenweg 15, D-88487 Walpertshofen (DE). SCHROEDER, Peter [DE/DE]; Hopfenweg 17, D-88471 Laupheim (DE). HOFER, Hans [DE/DE]; Beim Käppele 11, D-88487 Walpertshofen (DE).  <b>(74) Anwälte:</b> WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AU, CA, IL, JP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
<b>(54) Title:</b> LIQUID INTERFERON- $\beta$ FORMULATIONS  <b>(54) Bezeichnung:</b> FLÜSSIGE INTERFERON- $\beta$ -FORMULIERUNGEN  <b>(57) Abstract</b>  The invention relates to liquid formulations of human interferon- $\beta$ . The inventive formulations are characterised in that they have a buffer with a pH value in the slightly acidic to neutral range between 5 and 8, preferably between 5.5 and 8, and in that the interferon- $\beta$ is highly stable in solution, the molecular integrity being preserved.  <b>(57) Zusammenfassung</b>  Die vorliegende Erfindung betrifft flüssige Formulierungen von humanem Interferon- $\beta$ . Die Formulierungen sind dadurch gekennzeichnet, daß sie einen Puffer mit einem pH-Wert im schwach sauren bis neutralen Bereich zwischen 5 und 8, bevorzugt zwischen größer 5,5 und 8 aufweisen sowie eine hohe Stabilität des Interferon- $\beta$ in Lösung unter Beibehalt der molekularen Integrität gegeben ist.		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

## Flüssige Interferon- $\beta$ Formulierungen

### Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft flüssige Formulierungen von humanem Interferon- $\beta$ . Die Formulierungen sind dadurch gekennzeichnet, daß sie einen pH-Wert im schwach sauren bis neutralen Bereich zwischen 5 und 8 aufweisen sowie eine hohe Stabilität des Interferon- $\beta$  in Lösung unter Beibehalt der molekularen Integrität gegeben ist.

10

Natürlich vorkommende Interferone sind speziesspezifische Proteine, teilweise Glykoproteine, die durch unterschiedliche Zellen des Körpers nach Induktion mit Viren, doppelsträngiger RNA, anderen Polynukleotiden sowie Antigenen erzeugt werden. Interferone besitzen zahlreiche biologische Aktivitäten wie z.B. antivirale, antiproliferative sowie immunmodulatorische Eigenschaften. Es sind mindestens 3 unterschiedliche Typen humaner Interferone identifiziert worden, welche durch Leukozyten, Lymphozyten, Fibroblasten sowie Zellen des Immunsystems produziert werden und als  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Interferone bezeichnet werden. Einzelne Interferontypen können weiterhin in zahlreiche Subtypen unterteilt werden.

15

20

Natives, menschliches Interferon- $\beta$  kann durch Superinduktion humaner Fibroblastenzellkulturen mit Poly-IC sowie anschließende Isolierung und Reinigung des Interferon  $\beta$  durch chromatographische und elektrophoretische Techniken industriell hergestellt werden. Proteine oder Polypeptide, welche dem natürlichen Interferon- $\beta$  vergleichbare Eigenschaften aufweisen, können auch durch rekombinante DNA-Technologien hergestellt werden (EP-A-0 028 033; EP-A- 0 041 313; EP-A-0 070 906; EP-A-0 287 075; Chernajovsky et al. (1984) DNA 3, 297-308; McCormick et al. (1984) Mol. Cell. Biol. 4, 166-172). Dabei kann rekombinantes humanes Interferon- $\beta$  sowohl in eukaryontischen Zellen (z.B. CHO-Zellen) als auch von prokaryon-

25

30

- 2 -

tischen Zellen (z.B. E.coli) produziert werden. Die entsprechenden Interferone werden als Interferon- $\beta$ -1a bzw. Interferon- $\beta$ -1b bezeichnet. Im Gegensatz zu Interferon- $\beta$ -1b ist Interferon- $\beta$ -1a glykosiliert (Goodkin (1994) Lancet 344, 1057-1060).

5

Der therapeutische Einsatz von Interferon- $\beta$  setzt voraus, daß es in eine galenische Zubereitung gebracht wird, die das Protein über längere Zeit unter Erhaltung der molekularen Integrität lagerfähig macht. Interferon- $\beta$  ist instabil und unterliegt unterschiedlichen Abbaureaktionen. Hierzu gehören insbesondere die Spaltung von Peptidbindungen, Deamidierung, Oxidation des Methionins zu Methioninsulfid, Disulfidaustausch sowie Veränderungen der Zuckerseitenkette bis hin zur Deglycosilierung.

10

Aufgrund des therapeutischen Nutzens von Interferonen sind in den vergangenen Jahren eine Reihe von Formulierungen entwickelt worden, die jedoch alle gewisse Nachteile aufweisen. Das US-Patent Nr. 4,647,454 (Inter-Yeda Ltd.) beschreibt eine Formulierung von Fibroblasten Interferon- $\beta$ , die durch Zusatz von Polyvinylpyrrolidon (PVP) im stark sauren Bereich (pH 3,5) stabilisiert werden kann. Weitere bevorzugte Hilfsstoffe sind Mannitol, Humanserumalbumin sowie Acetatpuffer. Die Formulierung wird gefriergetrocknet und bei 4°C aufbewahrt.

15

20

Die japanische Patentschrift 59 181 224 (Sumitomo Chemical Co.) beschreibt eine wässrige Lösung von Interferonen, bei welcher polare Aminosäuren wie Arginin, Asparagin, Glutaminsäure, Glutamin, Histidin, Lysin, Serin sowie Threonin bzw. deren Natriumsalze zusammen mit Humanserumalbumin zur Stabilisierung der Interferone eingesetzt werden.

25

Die internationale Patentanmeldung WO 95/31213 (Applied Research Systems ARS Holding) beschreibt eine flüssige Formulierung für Interferon- $\beta$ , die durch Zusatz eines Polyols, bevorzugt Mannitol, und eines nicht-reduzierenden Zuckers oder einer Aminosäure stabilisiert wird. Die

30

- 3 -

Formulierung enthält weiterhin einen Puffer (Acetatpuffer pH 3,0 bis 4,0) sowie Humanserumalbumin. Während Rezepturen mit einem pH-Wert zwischen 5 und 6 einen sofortigen Verlust an biologischer Aktivität zeigten, sind die in der Patentschrift bevorzugten Rezepturen bei pH-Werten von 3,0  
5 sowie 4,0 hinreichend stabil. Die Aussage der Stabilität bezieht sich außerdem nur auf die biologische Aktivität der Formulierung, nicht aber auf die molekulare Integrität des Wirkstoffs.

Die europäische Patentanmeldung EP 0 215 658 (Cetus Corp.) beschreibt  
10 eine Formulierung für rekombinantes Interferon- $\beta$ , in welcher die biologisch aktive Verbindung in einem wässrigen Medium bei einem pH-Wert zwischen 2 und 4 unter Zusatz von Stabilisatoren wie Humanserumalbumin oder Humanplasmaproteinfraktionen sowie gegebenenfalls Dextrose gelöst wird. Eine weitere Patentanmeldung der Cetus Corp. (WO 89/05158) beschreibt  
15 eine Formulierung für Interferon- $\beta$ , die bei einem pH-Wert zwischen 2 und 4 als Stabilisatoren entweder Glycerin oder Polyethylenglycopolymere mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht zwischen 190 bis 1.600 Dalton einsetzen. Als geeignete Pufferkomponenten werden Glycin, Phosphorsäure sowie Zitronensäure genannt.

20 Die europäische Patentanmeldung EP 0 217 645 (Cetus Corp.) beschreibt pharmazeutische Zubereitungen mit IL-2 oder Interferon- $\beta$ , die in einem Trägermedium bei pH 7 bis 8 gelöst und unter Zusatz von Natriumlaurat als oberflächenaktive Verbindung stabilisiert sind. Darüber hinaus wird zur  
25 Stabilisierung dieser Zubereitungen auch SDS als weitere ionische oberflächenaktive Verbindung benötigt.

Das europäische Patent EP 0 270 799 (Cetus Oncology Corp.) beschreibt eine Formulierung für nichtglycosiliertes rekombinantes Interferon- $\beta$  in einem  
30 inerten Trägermedium auf Wasserbasis, das als Stabilisator nichtionische polymere Detergenzien enthält.

Die europäische Patentanmeldung EP 0 529 300 (Rentschler Biotechnologie GmbH) beschreibt flüssige Interferon- $\beta$ -Formulierungen, die eine Konzentration von 30 bzw. 70 MU/ml rekombinantes IFN- $\beta$ , Natriumchlorid und Imidazol- bzw. Natriumphosphatpuffer enthalten sowie einen pH-Wert von 7,5 aufweisen. (Beispiel 3). Diese Formulierungen sind für 4 Wochen bei einer Lagertemperatur von 25°C hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität stabil. Diese Zusammensetzungen haben jedoch den Nachteil, daß die verwendete Konzentration von Interferon- $\beta$  ( $\geq 30$  MU/ml) für praktische Anwendungen zu hoch ist. Darüber hinaus findet sich in EP-A-0 529 300 keinerlei Hinweis, daß durch Zusatz von Humanserumalbumin die Stabilität von flüssigen Interferon- $\beta$ -Formulierungen verringert wird. Im Gegenteil wird der Zusatz von Humanserumalbumin als bevorzugt bezeichnet.

Neben Formulierungen für Interferon- $\beta$  sind auch pharmazeutische Darreichungsformen mit Interferon- $\alpha$  beschrieben. Die europäische Patentschrift 0 082 481 (Schering Corp.) offenbart eine zur Gefriertrocknung bestimmte wässrige Formulierung, die neben einem Phosphatpuffer und Glycin Humanserumalbumin enthält. Als weiterer optionaler Bestandteil wird Alanin genannt. Der pH-Wert der Lösung nach Rekonstitution liegt zwischen 7,0 und 7,4. Eine weitere Patentanmeldung der Schering Corp. (WO 96/11018) offenbart stabile wässrige Lösungen im Interferon- $\alpha$ , die bei einem pH-Wert zwischen 4,5 und 7,1 Chelatbildner (NaEDTA oder Zitronensäure), eine oberflächenaktive Verbindung (Polysorbat 80), ein Isotonisierungsmittel (Natriumchlorid) sowie geeignete Konservierungsmittel wie Methylparaben, Propylparaben, m-Kresol oder Phenol beinhalten. Die offenbarten wässrigen Formulierungen erweisen sich bezüglich der biologischen Aktivität (Standardmethode der Hemmung des zytopathischen Effekts (CPE) eines Virus wie beschrieben bei W.P. Protzman in J. Clinical Microbiology, 1985, 22, S. 596-599) bei 25°C für 6 Monate als stabil (biologische Aktivität  $> 90\%$  der Ausgangsaktivität). Eine parallel durchgeführte Bestimmung des Proteingehalts mittels HPLC weist nach 6

- 5 -

Monaten bei 25°C jedoch bereits Gehaltsverluste zwischen 20,2 (Tab.3) oder 32,5% (Tab. 4) aus.

EP-A-0 736 303 (Hoffmann-LaRoche AG) offenbart wäßrige Interferon- $\alpha$ -Zusammensetzungen, die neben einem Interferon- $\alpha$  ein nichtionisches Detergens, einen Puffer zur Einstellung des pH-Bereiches zwischen 4,5 und 5,5, Benzylalkohol und gegebenenfalls ein isotonisierendes Mittel umfassen. Bei Bestimmung mittels HPLC wird nach dreimonatiger Lagerung bei 25°C und einer Ausgangskonzentration von 18 MU Interferon- $\alpha$ 2a ein Restgehalt von 84,5 % ermittelt, bei Weglassen des Stabilisators Benzylalkohol sinkt dieser Wert auf 62,8 %.

EP-A-0 641 567 (Ciba Geigy AG) beschreibt pharmazeutische Zusammensetzungen, die Hybrid-Interferon- $\alpha$  und als Stabilisator einen Puffer mit einem pH-Wert zwischen 3.0 und 5.0 enthalten.

Das US-Patent 5,358,708 (Schering Corp.) beschreibt wässrige Formulierungen von Interferon- $\alpha$ , die als Stabilisator Methionin, Histidin oder Mischungen davon enthalten. Nach zweiwöchiger Lagerung einer Interferon- $\alpha$  Lösung bei 40°C wird eine Abnahme des Wirkstoffgehalts um 20 % gefunden.

Die oben aufgeführten Formulierungen für Interferone sind aus heutiger Sicht mit Nachteilen behaftet, da z.B. auf Zusatz von Humanserumalbumin zur Stabilisierung von Proteinen aus Gründen der gestiegenen Anforderungen an die Sicherheit vor Viruskontaminationen durch Blutspender verzichtet werden sollte. Desweiteren ist für eine Vielzahl der oben beschriebenen Formulierungen ein Zusatz von Aminosäuren und/oder eine Gefriertrocknung erforderlich. Gefriergetrocknete Produkte sind jedoch in ihrer Herstellung sehr aufwendig und entsprechend teuer und erfordern durch die Notwendigkeit zur Rekonstitution einen zusätzlichen Arbeitsschritt, der insbesondere für Patienten mit eingeschränkter Motorik oftmals nur sehr schwer zu



- 6 -

vollziehen ist. Eine Reihe von Rezepturen weisen unphysiologische pH-Werte unterhalb von 5,0 auf. Obschon derartige Werte nicht gänzlich unüblich sind (siehe auch S. Sweetana und N.J. Aders, Journal of Pharmaceutical Sciences and Technology, 1996, 50: 330-342), muß bei intramuskulärer oder subkutaner Applikation mit schmerzhaften Irritationen gerechnet werden. Die Verwendung von oberflächenaktiven Verbindungen, wie Polysorbat 80, ist entsprechend Sweetana und Akers zwar zulässig, es sind jedoch eine Reihe von Nebenwirkungen insbesondere auch bei Kindern und Neugeborenen beschrieben, die den Einsatz derartiger Hilfsstoffe in Frage stellen. Über die Toxizität von oberflächenaktiven Verbindungen wird zusammenfassend bei Attwood und Florence (Surfactant Systems, their Chemistry, Pharmacy and Biology, Chapman and Hall; London, 1983) berichtet. Eine Übersicht über die Pharmakologie von Polysorbat 80 befindet sich bei R.K. Varma et al. (Arzneim.-Forsch./ Drug Res. 35, 1985, 804-808).

Aufgrund der oben genannten Nachteile, sollte eine optimale Formulierung für Interferon- $\beta$  folgende Eigenschaften in sich vereinigen:

- Erhalt der biologischen Aktivität über den Lagerzeitraum,
- Erhalt der molekularen Integrität des Wirkstoffmoleküls über den Lagerzeitraum,
- Flüssige Formulierung, Verzicht auf eine teure Gefriertrocknung sowie eine zusätzliche Rekonstitution,
- Verzicht auf risikobehaftete Hilfsstoffe wie Humanserumalbumin oder oberflächenaktive Verbindungen (Detergenzien),
- pH-Wert im neutralen bis schwach sauren Bereich.

Sämtliche Forderungen werden durch die im nachfolgenden Abschnitt genauer beschriebene Erfindung erfüllt.

- 7 -

Überraschenderweise wurde eine Rezepturzusammensetzung gefunden, welche die molekulare Integrität von Interferon- $\beta$  in flüssiger Form über einen langen Zeitraum in einem physiologischen pH-Bereich zwischen 5 und 8, bevorzugt zwischen größer 5,5 und 8 sicherstellt, ohne auf die als nachteilig bekannten Hilfsstoffe des Standes der Technik zurückgreifen zu müssen.

Ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung ist daher eine flüssige pharmazeutische Formulierung, die humanes Interferon- $\beta$  als Wirkstoff in einer Konzentration bis zu 25 MU/ml und einen Puffer zur Einstellung eines pH-Werts von zwischen 5 und 8, bevorzugt zwischen größer 5,5 und 8 enthält, frei von Humanserumalbumin ist und eine Langzeitstabilität der biologischen Aktivität (in vitro) von mindestens 80% der Ausgangsaktivität nach Lagerung bei 25°C für 3 Monate aufweist.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist eine flüssige pharmazeutische Formulierung, die humanes Interferon- $\beta$  als Wirkstoff und einen Puffer zur Einstellung eines pH-Werts zwischen 6 und 7,2 enthält, frei von Humanserumalbumin ist und eine Langzeitstabilität der biologischen Aktivität (in vitro) von mindestens 80% der Ausgangsaktivität nach Lagerung bei 25°C für 3 Monate aufweist.

Noch ein weiterer Aspekt der Erfindung ist eine flüssige pharmazeutische Formulierung, die humanes IFN- $\beta$  als Wirkstoff, einen Puffer zur Einstellung eines pH-Werts zwischen 5 und 8, bevorzugt zwischen größer 5,5 und 8 und eine oder mehrere Aminosäuren enthält und eine Langzeitstabilität der biologischen Aktivität (in vitro) von mindestens 80% der Ausgangsaktivität nach Lagerung bei 25°C für 3 Monate aufweist.

Die Messung der Langzeitstabilität von flüssigen pharmazeutischen Formulierungen erfolgte bei 25°C. Die Temperatur von 25°C wurde gewählt, um auf der einen Seite eine Beschleunigung von Abbaureaktionen zu bewirken, auf der anderen Seite jedoch keine durch überhöhte Temperaturen bewirk-

ten Artefakte hervorzurufen. Geeignete analytische Methoden zur Bestimmung der Stabilität von Interferon- $\beta$  sind in den Übersichtsartikeln von J. Geigert (J. Parent. Sci. Technol. 43 (1989), 220-224) oder M.C. Manning, K. Patel und R.T. Borchardt (Pharm. Res. 6 (1989), 903-918) beschrieben.

5

Die Messung der biologischen Aktivität nach der jeweils gewählten Aufbewahrungsdauer erfolgte durch die Standardmethode der Inhibierung des zytopathischen Effekts eines Virus. Eine genaue Beschreibung der verwendeten Testmethode findet sich bei Stewart, W.E. II (1981): The Interferon System (Second, enlarged Edition), Springer-Verlag: Wien, New York; Grossberg, S.E. et al. (1984), Assay of Interferons. In: Came, P.E., Carter W.A (eds) Interferons and their Applications, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, pp. 23-43. Eine erfindungsgemäße Formulierung weist nach dreimonatiger Aufbewahrung bei 25°C eine biologische Aktivität von mindestens 80%, vorzugsweise von mindestens 85% und besonders bevorzugt von mindestens 90% der Ausgangsaktivität auf.

10

15

20

Vorzugsweise besitzt eine erfindungsgemäße Formulierung nach sechsmonatiger Aufbewahrung bei 25°C eine biologische Aktivität von mindestens 80% und vorzugsweise von mindestens 85% der Ausgangsaktivität.

25

Auch bei einer Aufbewahrung bei höheren Temperaturen, z.B. 37°C, weisen die erfindungsgemäßen Formulierungen eine überraschend hohe Langzeitstabilität der biologischen Aktivität auf. So wird nach einer einmonatigen Aufbewahrung bei 37°C eine biologische Aktivität von mindestens 70% und vorzugsweise von mindestens 80% der Ausgangsaktivität gefunden.

30

Die erfindungsgemäßen flüssigen pharmazeutischen Formulierungen sind vorzugsweise frei von Humanserumalbumin und besonders bevorzugt - abgesehen vom Wirkstoff - frei von humanen oder tierischen Polypeptiden insbesondere von Serumproteinen. Weiterhin ist bevorzugt, daß die erfindungsgemäße flüssige pharmazeutische Formulierung frei von

oberflächenaktiven Mitteln, insbesondere frei von ionischen Detergenzien oder/und nichtionischen Tensiden ist.

Die erfindungsgemäßen Formulierungen enthalten als Wirkstoff ein Interferon- $\beta$ , d.h. ein Polypeptid, welches biologische oder/und immunologische Eigenschaften von natürlichem humanem Interferon- $\beta$  aufweist und ein natürlich vorkommendes oder rekombinantes Interferon- $\beta$  sein kann. Vorzugsweise enthält die Formulierung ein glykosiliertes Interferon- $\beta$ , besonders bevorzugt ein rekombinantes Interferon- $\beta$  aus CHO-Zellen. Am meisten bevorzugt werden Interferon- $\beta$  Spezies verwendet, wie sie aus der Zelllinie BIC 8622 (ECACC 87 04 03 01) erhältlich sind und beispielsweise in EP-B-O 287 075 und EP-A-O 529 300 beschrieben sind.

Der Wirkstoff liegt in den erfindungsgemäßen Formulierungen vorzugsweise in einer Konzentration bis zu 25 MU/ml vor. Bevorzugt ist jedoch eine Dosierung im Bereich von 1 bis 25 MU/ml, besonders bevorzugt von 3 bis 20 MU/ml, am meisten bevorzugt 3 bis 10 MU/ml. Diese Dosierungsbereiche erlauben eine unmittelbare Anwendung ohne weitere Verdünnung in Verbindung mit einer besonders guten Stabilität bei erhöhter Temperatur.

Ein weiteres bevorzugtes Merkmal der erfindungsgemäßen flüssigen pharmazeutischen Formulierung ist, daß sie eine chemische Integrität nach Lagerung bei 25°C für 3 Monate und vorzugsweise für 6 Monate aufweist, d.h. daß sie beständig gegenüber Peptidspaltung, Oxidation und Deglykosylierung ist. Die Messung der chemischen Integrität erfolgt durch Peptidmapping, Westernblot sowie Glykosylierungsanalyse. Als chemisch stabil im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung sind Zusammensetzungen zu betrachten, bei welchen das Interferon- $\beta$  im Anschluß an die Formulierung mindestens 85%, vorzugsweise mindestens 90% der chemischen Integrität bei den gewählten Lagerungsbedingungen beibehält.

Ein weiteres bevorzugtes Merkmal der erfindungsgemäßen flüssigen pharmazeutischen Formulierungen ist eine physikalische Integrität nach Lagerung bei 25°C für 3 Monate und vorzugsweise für 6 Monate. Dabei wird die physikalische Integrität durch Messung der Transmission bei 420 nm sowie durch visuelle Betrachtung der Lösungen gemessen. Als physikalisch stabil sind diejenigen Lösungen anzusehen, deren Transmission über 90%, vorzugsweise über 93% bei den gewählten Lagerungsbedingungen liegt, und bei welchen keine Trübung bei visueller Betrachtung festgestellt werden kann.

Durch die vorliegende Erfindung können überraschenderweise flüssige Formulierungen von Interferon- $\beta$  bereitgestellt werden, die über einen langen Zeitraum biologisch, chemisch und physikalisch stabil sowie frei von unerwünschten Inhaltsstoffen wie etwa Humanserumalbumin oder oberflächenaktiven Mitteln sind. Die erfindungsgemäßen Formulierungen enthalten neben dem Wirkstoff einen Puffer, der vorzugsweise in einer Konzentration von 10 mmol/l bis 1 mol/l, besonders bevorzugt in einer Konzentration von 20 mmol/l bis 200 mmol/l, z.B. ca. 50 mmol/l bis 100 mmol/l vorliegt und dazu dient, den pH-Wert der Formulierung im Bereich von 5 bis 8, bevorzugt von größer 5,5 bis 8 und stärker bevorzugt zwischen 6 und 7,4 zu halten. Besonders bevorzugt ist ein pH-Bereich zwischen 6 und 7,2 und am meisten bevorzugt zwischen 6,2 und 6,8, da hier eine besonders hohe Stabilität unter Beibehalt der molekularen Integrität erreicht wird. Der Puffer wird aus pharmazeutisch akzeptablen Puffern ausgewählt, z.B. Borat-, Succinat-, L-Malat-, TRIS-, Salicylat-, Glycylglycin-, Triethanolamin-, Isocitrat-, Maleat-, Phosphat-, Citrat- und Acetatpuffer oder Mischungen davon. Bevorzugt verwendet man Phosphat-, Citrat- und Acetatpuffer oder Mischungen davon, besonders bevorzugt Phosphat/Citratpuffer.

Die erfindungsgemäße Formulierung kann neben dem Wirkstoff und dem Puffer weitere physiologisch verträgliche Hilfsstoffe enthalten, beispielsweise Hilfsstoffe zur Anpassung der Tonizität an die Tonizität des Blutes

oder Gewebe, z.B. nichtreduzierende Zucker, Zuckeralkohole wie Mannit, Sorbit, Xylit oder Glycerin. Außerdem können der erfindungsgemäßen Formulierung eine oder mehrere Aminosäuren wie z.B. Alanin, Arginin, Glycin, Histidin oder/und Methionin zur weiteren Erhöhung der chemischen Stabilität zugesetzt werden. Bevorzugt ist hierbei Methionin. Die Konzentration von Methionin liegt vorzugsweise im Bereich von 0,1 bis 4 mmol/l. Besonders bevorzugt ist eine Konzentration vom 2 mmol/l. Weiterhin kann die Zusammensetzung Verdickungsmittel zur Viskositätserhöhung, z.B. für ophthalmologische Zwecke, enthalten. Beispiele für geeignete Verdickungsmittel sind ophthalmologisch geeignete Polymere, z.B. Carbopol, Methylcellulose, Carboxymethylcellulose etc.

Darüber hinaus kann die erfindungsgemäße Zusammensetzung auch Konservierungsmittel enthalten. Für ophthalmologische Zwecke kann beispielsweise Thiomersalin in einer Menge von 0,001 bis 0,004% (Gewicht/Volumen) zum Einsatz kommen.

Die Erfindung betrifft weiterhin pharmazeutische Präparate, die eine flüssige Interferon- $\beta$  enthaltende Formulierung wie oben beschrieben enthalten. Diese pharmazeutischen Präparate sind insbesondere für die orale, parenterale oder ophthalmologische Applikation geeignet. Die Formulierungen liegen vorzugsweise in Einzeldosen von 1 bis 25 MU IFN- $\beta$  vor. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung derartiger pharmazeutischer Präparate, wobei man eine erfindungsgemäße Formulierung und gegebenenfalls weitere galenisch notwendige Hilfsstoffe zubereitet und in eine geeignete Darreichungsform bringt.

Die erfindungsgemäße Formulierung kann in geeigneten, gewaschenen sowie sterilisierten Glasvials (hydrolytische Klasse 1) mit pharmazeutisch akzeptablen Gummistopfen gelagert werden.

Desweiteren können erfindungsgemäße Formulierungen auch aseptisch in Fertigspritzen oder aber in Karpulen zum Einsatz in Selbstinjektionssystemen abgefüllt und eingesetzt werden. Die wässrigen Lösungen können - obwohl dies nicht bevorzugt ist - durch Zusatz weiterer, dem Fachmann bekannter Hilfsstoffe gefriergetrocknet werden und stehen dann nach Rekonstitution in flüssiger Form zur Verfügung.

Unter Zusatz von geeigneten Konservierungsmitteln können flüssige Mehrfachdosisarzneiformen sowie Augentropfenlösungen und Tropflösungen zur oralen Applikation hergestellt werden.

Die zur Herstellung der entsprechenden Darreichungsformen noch zusätzlich benötigten Hilfsstoffe sind dem Fachmann bekannt.

Schließlich betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Verbesserung der Haltbarkeit einer flüssigen Formulierung, die humanes Interferon- $\beta$  als Wirkstoff und einen Puffer zur Einstellung eines pH-Werts von 5 bis 8, bevorzugt von größer 5,5 bis 8 enthält, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Formulierung ohne Human-serumalbumin oder/und mit einer oder mehreren Aminosäuren verwendet. Die Verbesserung der Haltbarkeit umfaßt eine Verbesserung der Langzeitstabilität der biologischen Aktivität (in vitro), der chemischen Integrität oder/und der physikalischen Integrität wie vorstehend angegeben.

Weiterhin wird die Erfindung durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

### Beispiele

In allen Beispielen wurde ein aus CHO-Zellen gewonnenes Interferon- $\beta$  verwendet.

#### 1. Langzeitstabilität von flüssigen Interferon- $\beta$ Formulierungen bei 25°C

Es wurden folgende Formulierungen getestet:

- 13 -

Formulierung 1: 50 mmol/l Natriumcitrat pH 5,0

Formulierung 2: 50 mmol/l Natriumcitrat, 50 mmol/l, Natriumphosphat  
pH 7,0, 15 mg/ml Humanserumalbumin, 2 mmol/l  
Methionin, 50 mg/ml Glycerin

5 Formulierung 3: 50 mmol/l Natriumcitrat, 50 mmol/l Natriumphosphat  
pH 7,0, 50 mg/ml Glycerin, 2 mmol/l Methionin

Formulierung 4: 50 mmol/l Natriumcitrat, 50 mmol/l Natriumphosphat  
pH 7,0, 2 mmol/l Methionin

Formulierung 5: 50 mmol/l Natriumcitrat, 50 mmol/l Natriumphosphat  
10 pH 7,0

Formulierung 17: 70 mmol/l Natriumcitrat, 50 mmol/l Natriumphosphat,  
2 mmol/l Methionin, pH 6,5

Die Formulierungen wurden auf einen Gehalt von ca. 10 bis 15 MU/ml (d.h.  
15 10 bis 15 x 10<sup>6</sup> I.E./ml) verdünnt.

Die Formulierungen wurden mit Ausnahme von Formulierung 17 (s.u.) in  
Glasvials der hydrolytischen Klasse 1 (DIN 2R Vials), die mit handelsübli-  
chen Chlorbuthylgummistopfen verschlossen waren, bei 25°C für die  
20 angegebene Zeitdauer gelagert. Die Bestimmung der biologischen Aktivität  
(in vitro) erfolgte, wie beschrieben bei Stewart, W.E. II (1981): The  
Interferon System (Second, enlarged edition) Springer-Verlag: Wien, New  
York; Grossberg, S.E. et al. (1984) Assay of Interferons. In: Came, P.E.,  
Carter W.A. (eds.) Interferons and their Applications, Springer-Verlag:  
25 Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, pp. 23-43.

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 1 bis 5 dargestellt. Bei "% (Ref)"  
handelt es sich um die Angabe der biologischen Aktivität bezogen auf die  
biologische Aktivität einer bei -20°C für den angegebenen Zeitraum  
30 gelagerten Referenzprobe. Bei "% (0Mo)" handelt es sich um die prozentu-  
ale biologische Aktivität bezogen auf den Ausgangswert bei 0 Monaten.



Tabelle 1 (Formulierung 1):

Monate	Wirkstoffgehalt			
	MU/mL		Recovery (25°C)	
	-20°C	25°C	% (Ref.)	% (0Mo.)
0	11,0	11,0	100	100
1	10,0	9,8	98	89
2	9,7	11,0	113	100
3	10,0	10,6	106	96
4	10,3	9,5	92	86
5	9,5	9,7	102	88
6	10,5	10,2	97	93

Tabelle 2 (Formulierung 2):

Monate	Wirkstoffgehalt			
	MU/mL		Recovery (25°C)	
	-20°C	25°C	% (Ref.)	% (0Mo.)
0	13,9	13,9	100	100
1	14,0	11,9	85	86
2	13,0	11,6	89	83
3	13,1	9,6	73	69
4	12,5	8,8	70	63
5	11,0	8,2	75	59
6	13,3	8,4	63	60

Tabelle 3 (Formulierung 3):

Monate	Wirkstoffgehalt			
	MU/mL		Recovery (25°C)	
	-20°C	25°C	% (Ref.)	% (0Mo.)
0	12,5	12,5	100	100
1	9,4	10,0	106	80
2	8,3	11,5	139	92
3	7,8	11,8	151	94,4
4	6,8	10,3	151	82,4
5	6,6	11,2	170	89,6
6	7,8	13,4	172	107,2

Tabelle 4 (Formulierung 4):

Monate	Wirkstoffgehalt			
	MU/mL		Recovery (25°C)	
	-20°C	25°C	% (Ref.)	% (0Mo.)
0	11,4	11,4	100	100
1	10,5	10,2	97	89
2	11,9	11,1	93	97
3	10,8	10,0	93	88
4	10,4	9,3	89	82
5	11,6	8,4	72	74
6	12,4	9,5	77	83

Tabelle 5 (Formulierung 5):

Monate	Wirkstoffgehalt			
	MU/mL		Recovery (25°C)	
	-20°C	25°C	% (Ref.)	% (0Mo.)
0	11,3	11,3	100	100
1	11,0	9,7	88	86
2	11,7	10,1	86	89
3	11,1	10,2	92	90
4	11,3	10,2	90	90
5	12,0	9,2	77	81
6	11,0	9,7	88	86

Aus den obigen Tabellen ist ersichtlich, daß Formulierungen, die kein Humanserumalbumin enthalten (Formulierungen 1, 3, 4, 5), überraschenderweise eine bessere Stabilität als eine Humanserumalbumin enthaltende Formulierung (Formulierung 2) aufweisen.

Bei Formulierung 17 (s.o.) wurde eine Interferonlösung ohne Humanserumalbumin unter aseptischen Bedingungen auf eine Aktivität von 6 MU/0,5 ml eingestellt. Die farblose, klare Lösung wurde anschließend steriltriftriert und zu je 0,5 ml in vorsterilisierten Einmalspritzen abgefüllt und verschlossen. Die Fertigspritzen wurden bei 25°C gelagert und auf Klarheit, pH-Wert sowie biologische Aktivität untersucht. Dabei ergaben sich folgende Resultate:

- 17 -

Lagerung in Mona- ten	pH- Wert	Klarheit [%]	MU/Spritze		Recovery (25°C)	
			-20°C	25°C	%(Ref.)	%(OMo.)
0	6,5	99,5	6,3	6,3	100	100
3	6,5	99,1	5,6	6,1	108	97

## 2. Langzeitstabilität von flüssigen IFN- $\beta$ Formulierungen bei 37°C

Es wurden folgende Formulierungen in Fertigspritzen getestet:

Formulierung 6: 50 mmol/l Natriumcitrat, 50 mmol/l Natriumphosphat  
pH 7,0, 2 mmol/l Methionin

Formulierung 7: 50 mmol/l Natriumcitrat pH 5,0, 18 mg/ml Glycerin, 2  
mmol/l Methionin

Formulierung 8: 50 mmol/l Natriumcitrat pH 5,0, 18 mg/ml Glycerin, 15  
mg/ml Humanserumalbumin, 2 mmol/l Methionin

Formulierung 9: 50 mmol/l Natriumcitrat pH 6,0, 18 mg/ml Glycerin, 2  
mmol/l Methionin

Formulierung 10: 50 mmol/l Natriumcitrat pH 6,5, 18 mg/ml Glycerin, 2  
mmol/l Methionin

Die Formulierungen wurden in Dosisstärken von 3 MU pro 0,5 ml (Dosis-  
stärke 3), 6 MU pro 0,5 ml (Dosisstärke 6) und 12 MU pro ml (Dosisstärke  
12) getestet.

Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6

Lagerung in Monaten	Dosisstärke 3						Dosisstärke 6						Dosisstärke 12					
	Formulierung						Formulierung						Formulierung					
	6	7	8	9	10		6	7	8	9	10		6	7	8	9	10	
0	100	100	100	100	100		100	100	100	100	100		100	100	100	100	100	
1	71	80	61	74	69		72	85	63	86	84		87	88	71	76	84	
2	51	82	33	74	85		61	81	43	80	76		69	88	48	77	81	
3	44	76	23	63	65		48	64	36	73	69		66	72	35	80	81	
4	33	51	16	61	61		46	65	26	84	-		-	64	24	78	79	

Aus den Ergebnissen von Tabelle 6 ist ersichtlich, daß die erfindungsgemäßen Formulierungen ohne Humanserumalbumin überraschenderweise eine verbesserte Stabilität bei 37°C aufweisen.

5     3. Chemische Stabilität bei 25°C

Um die chemische Stabilität flüssiger Formulierungen von IFN-β zu untersuchen, wurden 7 Ansätze formuliert und bei 25°C eingelagert. Nach 3 bzw. 6 Monaten erfolgte eine Charakterisierung des Proteins mittels eines  
10   Lys-C-Mappings und einer kompletten Kohlenhydratanalytik. Ein spezielles Augenmerk wurde auf die Bildung von Methionin-Sulfoxid und die Desialyierung gelegt.

Außer Formulierung 10 (s.o.) wurden folgende Formulierungen getestet:

15

Formulierung 11: 50 mmol/l Natriumcitrat, 50 mmol/l Natriumphosphat,  
2 mmol/l Methionin pH 7,0 bis 7,2

Formulierung 12: 50 mmol/l Natriumcitrat, 50 mmol/l Natriumphosphat  
pH 7,0 bis 7,2

20

Formulierung 13: 50 mmol/l Natriumcitrat, 18 mg/ml Glycerin, 2 mmol/l  
Methionin, pH 5,0 bis 5,2

Formulierung 14: 50 mmol/l Natriumcitrat, 18 mg/ml Glycerin, pH 5,0 bis  
5,2

25

Formulierung 15: 50 mmol/l Natriumcitrat, 15 mg/ml Humanserumalbumin  
(Medical Grade), 18 mg/ml Glycerin, 2 mmol/l Methio-  
nin, pH 5,0 bis 5,2

Formulierung 16: 50 mmol/l Natriumcitrat, 15 mg/ml Humanserumalbumin  
(Medical Grade), 18 mg/ml Glycerin, pH 5,0 bis 5,2  
(Vergleich)

30

Der Gehalt an IFN-β lag bei allen Ansätzen zwischen 10 und 11 MU/ml.

Testdurchführung

Für die Durchführung der Analytik war eine Aufkonzentrierung der Proben notwendig. Zudem mußte bei den Ansätzen 15 und 16 das Humanserumalbumin entfernt werden. Deshalb wurden die Ansätze über eine Anti- $\beta$ -Chromatographiesäule gegeben. Das Ausgangsvolumen pro Ansatz betrug 32 ml. Die Ansätze 13 bis 16 wurden durch Zugabe von 2,1 ml 0,4 mol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 2,1 ml 0,4 mol/l  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  vor der Anti- $\beta$ -Chromatographie neutralisiert.

Für die Immunadsorption von Interferon- $\beta$  an einem monoklonalen Antikörper gegen Interferon- $\beta$  (B02 Sepharose 6B, cross linked von der Firma Celltech) wurde eine Chromatographiesäule C10 (Firma Pharmacia) mit 5 ml B02-Sepharose gepackt und 3 mal mit je 5-10 Gelvolumina PBS, 0,1 mol/l Natriumphosphat pH 2,0 und PBS/1 mol/l KCl, mit einer linearen Flußrate von 1,0 cm/min gespült.

Der Auftrag von ca. 32 ml der Interferon/HSA haltigen Lösung erfolgte mit einer linearen Flußrate von 0,5 cm/min.

Die Waschung erfolgte mit 10 Gelvolumina PBS/1 mol/l KCl mit einer linearen Flußrate von 1 cm/min bis zum Abfall der OD auf die Grundlinie. Die Elution erfolgte mit ca. 1-2 Gelvolumina 0,1 mol/l Natriumphosphat pH 2,0 mit einer linearen Flußrate von 1 cm/min. Interferon- $\beta$  wird dabei als einzelner Peak in hoher Reinheit erhalten. Dieses Eluat ist für die sich anschließende Proteincharakterisierung geeignet.

Durchführung der Analytik

## 1. Lys-C-Mapping

- 5 Mit dem Enzym Endoproteinase Lys-C aus *Achromobacter* (AP) wird Interferon- $\beta$  unter reduzierenden Bedingungen am C-terminalen Ende von Lysin in 12 Peptide gespalten.

- 10 In ein Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 50  $\mu$ l Eluat aus der Anti- $\beta$ -Chromatographie (12,5-50  $\mu$ g Interferon- $\beta$ ) gegeben und mit 5  $\mu$ l 2 mol/l TRIS versetzt. Dazu wurde Endoproteinase der Firma Wako in einem Enzym/Substratverhältnis von 1:10 zugegeben (Endoproteinase Lys-C-Lösung in 50 mmol/l TRIS/HCl, pH 9,0) Die Lösung wurde gemischt und bei 30°C 2 Stunden inkubiert. Danach erfolgte eine Zugabe von 5  $\mu$ l 0,1 mol/l  
15 DTT zum Ansatz.

- Die Auftrennung der Peptide erfolgte über eine Reversed Phase Säule (Vydac C18, 300 Å, 5  $\mu$ m, 2,1 mm) an einer HPLC-Anlage HP 1090 M-Serie mit Diodenarraydetektor bei 214 nm, wobei ein Gradient aus A: 0,1% (v/v)  
20 TFA und B: 0,1% (v/v) TFA/70% (v/v) Acetonitril verwendet wurde. Die Peptide wurden in der Reihenfolge ihrer Retentionszeiten durchnummeriert und sind folgenden Sequenzen zugeordnet.



- 22 -

SEQ. ID. NO	Peptid	Position	Sequenz
1	AP1	109-115	EDFTRGK
2	AP2	100-105	TVLEEK
3	AP3	46-52	QLQQFQK
4	AP4(ox)	116-123	LM(ox)SSLHLK
5	AP4	116-123	LMSSLHLK
6	AP6(ox)	34-45	DRM(ox)NFDIPEEIK
7	AP5	124-134	RYYGRILHYLK
8	AP6	34-45	DRMNFDIPEEIK
9	AP7	20-33	LLWQLNGRLEYCLK
10	AP8(ox)	1-19	M(ox)SYNLLGFLQRSSNFQCQK
11	AP8	1-19	MSYNLLGFLQRSSNFQCQK
12	AP9	137-166	EYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRN
13	AP10(ox)	53-99	EDAALTIYEM(ox)LQNIFAIFRQDSSS TGWNETIVENLLANVYHQINHLK
14	AP10	53-99	EDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSS TGWNETIVENLLANVYHQINHLK

## Literatur:

Utsumi et al. (1989). Characterization of four different mammalian-cell-derived recombinant human interferon- $\beta$ 1. Eur. J. Biochem. 181, 545-553.

Utsumi et al. (1988): Structural characterization of fibroblast human interferon- $\beta$ 1. J. Interferon Res. 8, 375-384

Allen, G. (1981): Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Sequencing of proteins and peptides. Elsevier Verlag.

Castagnola et al. (1988): HPLC in Protein sequence determinations. J. Chromatography 440, 213-251.

In den mit (ox) bezeichneten Peptiden liegt die Aminosäure Methionin als Methioninsulfoxid vor. Die Quantifizierung beruht auf der Bestimmung des Anteils der Peakfläche des oxidierten Peptides zur Gesamtfläche aus intaktem Peptid und oxidiertem Peptid. Die Anteile an oxidierten Methioninen sind in frischen Präparationen von Interferon- $\beta$  sehr gering. Während der Lagerung nimmt dieser Anteil je nach Lagerbedingungen (Puffer, pH-Wert, Temperatur etc.) mehr oder weniger stark zu. Diese Veränderung ist nicht gewünscht, da sie zur Instabilität des Interferon- $\beta$ -Moleküls beiträgt bzw. die in vivo Eigenschaften signifikant beeinflussen kann.

Der Anteil der oxidierten Peptide AP4(ox), AP6(ox), AP8(ox) und AP10(ox) ist somit ein wichtiges Kriterium zur Bewertung der chemischen Integrität des Interferon- $\beta$ -Moleküls in einer flüssigen Formulierung.

## 2. Kohlenhydratbestimmung

Im ersten Schritt wurden die Oligosaccharide vom Polypeptid abgetrennt und entsalzt.

Etwa 0,7 ml des Eluats der Anti- $\beta$ -Chromatographie wurden in einem Dialyseschlauch (6 mm Durchmesser Sigma No. D-9277) gegen 500 ml Dialysepuffer (0,05 mol/l Natriumphosphat, 0,10 mol/l NaCl, pH 7,25) unter leichtem Rühren 16-20 Stunden bei Raumtemperatur dialysiert. Danach wurde der Schlauch an einem Ende aufgeschnitten und der Inhalt in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gestreift. Das Probenvolumen betrug nach der Dialyse 1 ml.

Zu der dialysierten Probe wurden 20  $\mu$ l Tween 20 (10%ig) und 15  $\mu$ l N-Glycosidase-F-Lösung (Boehringer Mannheim) pipettiert. Dieses Gemisch

wurde 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Abschluß der Inkubation wurde bei 10.000 U/min 10 min zentrifugiert, über 0,45 µm filtiert und anschließend über eine Entsalzungssäule (HR 10/10 Pharmacia No. 17-0591-01) mit einem isokratischen Gradienten (Eluent A: destilliertes Wasser) mit einem Fluß von 1,0 ml/min chromatographiert und fraktioniert. Die Detektion der freien Oligosaccharide erfolgte bei 206 nm.

Im zweiten Schritt wurden die freigesetzten Oligosaccharide über einen Ionenaustauscher aufgetrennt nach der Anzahl ihrer Sialinsäurenreste differenziert.

Die im Eluat der Entsalzungssäule, ca. 2 ml, enthaltenen Oligosaccharide wurden an einen Anionenaustauscher (Mono Q HR 5/5, Pharmacia No. 17-0546-01) gebunden. Die Asialoformen finden sich im Durchlauf. Mit Hilfe eines flachen NaCl-Gradienten eluierten Monosialo-, Disialo- und Trisialoformen in der angegebenen Reihenfolge deutlich getrennt nacheinander.

Eluent A: Milli-Q-Wasser

Eluent B: 0,10 mol/l NaCl

Gradient

0 min	100% A	0% B
5 min	100% A	0% B
25 min	33% A	67% B
26 min	100% A	0% B

Fluß: 0,75 ml/min

Laufzeit: 26 min (mit Regeneration 36 min)

Detektion: UV 206 nm

Die Detektion der einzelnen Oligosaccharidfraktionen erfolgte mittels eines UV-Detektors bei 206 nm. Die quantitative Berechnung wurde über die Integration der Flächen der einzelnen Peaks durchgeführt.

- 5 Die Oligosaccharidfraktionen Monosialo, Disialo und Trisialo wurden anschließend, wie oben beschrieben, über eine Entsalzungssäule geleitet.

Im dritten Schritt werden die geladenen Oligosaccharide in neutrale Oligosaccharide überführt, indem unter sauren pH-Bedingungen die  
10 endständigen Sialinsäurenreste hydrolytisch abgespalten wurden.

Dazu wurden von jeder Oligosaccharidfraktion ca. 15  $\mu$ l plus 15  $\mu$ l Milli Q Wasser in ein Mikroteströhrchen gegeben und 30  $\mu$ l 10 mmol/l  $H_2SO_4$  zugefügt. Anschließend wurde 90 min lang auf 80°C erhitzt.

15

Danach wurde 1 min bei 5000 U/min zentrifugiert und der Ansatz in ein Minivial pipettiert. Die jetzt neutralen Kohlenhydrate werden bei alkalischem pH-Wert zu schwachen Anionen und an eine Anionenaustauschersäule (CarboPac PA1 (4x250 mm) P/N 35391, Dionex) gebunden. Die Elution  
20 erfolgt mit einem Gradienten aus

Eluent A: NaOH 0,16 mol/l

Eluent B: NaOH 0,16 mol/l Na-Acetat 0,10 mol/l

Eluent C: NaOH 0,16 mol/l Na-Acetat 0,75 mol/l

25

Gradient:

0 min	95% A	5% B	0% C
2,0 min	95% A	5% B	0% C
3,0 min	85% A	15% B	0% C
4,0 min	85% A	15% B	0% C
28,0 min	37% A	63% B	0% C
28,1 min	90% A	0% B	10% C
45,0 min	20% A	0% B	80% C
45,1 min	95% A	5% B	0% C
50,0 min	95% A	5% B	0% C

Fluß: 1,0 ml/min

Laufzeit: 50 min

Detektion: PAD

Zur Bestimmung der Oligosaccharide wird die PAD (Pulsed Amperometric Detection) verwendet. Das Oligosaccharidmolekül wird elektrochemisch oxidiert und der dabei entstehende Strom gemessen. Die PAD zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit aus, so daß ein Nachweis im ng-Bereich ohne Schwierigkeiten möglich ist. Das Ausgangssignal am Detektor (in mV) ist der Menge an Kohlenhydrat direkt proportional. Die Quantifizierung erfolgt über die Integration der Peakflächen.

Die Proben wurden zwischen der Deglykosilierung und der Analyse bei -20°C zwischengelagert.

Literatur:

Townsend (1988): High-performance anion-exchange chromatography of oligosaccharides. Analytical Biochemistry 174, 459-470.

Ergebnisse

## 1. Lys-C-Mapping

- 5 Das Lys-C-Mapping der Ansätze 11 bis 16 zeigte hinsichtlich der Retentionszeit und der Qualifizierung der Peptide keinen Unterschied zum Ausgangswert.

- 10 Die Bestimmung des Gehalts von Methioninsulfoxid während der Flüssiglagerung ergab die in den Tabellen 7 (Lagerung für 3 Monate) und 8 (Lagerung für 6 Monate) gezeigten Ergebnisse.

Tabelle 7

	Bezeichnung	Anteil AP4ox	Anteil AP6ox	Anteil AP8ox	Anteil AP10ox
15	to-Wert	< 5%	7,6%	LOD	LOD
	Formulierung 11	7,9%	10,5%	LOD	LOD
	Formulierung 12	< 5%	11,6%	LOD	LOD
	Formulierung 13	< 5%	7,3%	LOD	LOD
	Formulierung 14	< 5%	9,4%	LOD	LOD
20	Formulierung 15	< 5%	8,6%	LOD	LOD
	Formulierung 16	< 5%	10,8%	LOD	LOD

(LOD = nicht nachweisbar)

Tabelle 8

Bezeichnung	Anteil AP4ox	Anteil AP6ox	Anteil AP8ox	Anteil AP10ox
to-Wert	< 5%	7,6%	LOD	LOD
Formulierung 10	7,6%	8,9%	LOD	LOD
Formulierung 11	7,7%	9,5%	LOD	LOD
Formulierung 12	12,0%	13,7%	LOD	LOD
Formulierung 13	7,4%	8,7%	LOD	LOD
Formulierung 14	13,7%	15,7%	LOD	LOD
Formulierung 15	7,4%	7,9%	LOD	LOD
Formulierung 16	18,0%	17,6%	LOD	LOD

Aus Tabelle 7 ist ersichtlich, daß bei einer dreimonatigen Lagerung die methioninhaltigen Ansätze 13 und 15 gegenüber den methioninfreien Ansätzen einen geringeren Anteil an Methioninsulfoxid zeigen. Nach einer sechsmonatigen Lagerung wird der Einfluß des zugesetzten Methionins in den Ansätzen 11, 13 und 15 deutlicher. Dort ist nur eine sehr geringe Zunahme des Gehalts an Methioninsulfoxid nachweisbar. In den methioninfreien Ansätzen nimmt der Gehalt an Methioninsulfoxid etwas stärker zu, liegt aber in der Summe aller oxidierten Methioninanteile zum Gesamtgehalt an Methionin unter 10%.

## 2. Kohlenhydratbestimmung

In den Tabellen 9a, 9b, 10a, 10b, 11a und 11b sind die Ergebnisse der Kohlenhydratbestimmung nach drei bzw. nach 6 Monaten Lagerzeit angegeben.

Interferon- $\beta$ -1a besitzt an seiner Aminosäurenkette eine Kohlenhydratstruktur, die sich aus einer definierten Reihenfolge von Monosacchariden aufbaut. Je nach Verzweigungsart spricht man von biantennären (2 Arme), triantennären (3 Arme) und tetraantennären (4 Arme) Strukturen.

5

Die Kohlenhydratstruktur baut sich aus den Monosacchariden Mannose, Fucose, N-Acetylglucosamin, Galactose und Sialinsäure auf.

Dabei nimmt die Sialinsäure in mehrfacher Hinsicht eine Sonderstellung ein:

- 10 - Sie ist das einzige Monosaccharid mit einer geladenen Gruppe (Carboxylgruppe).
- Sie tritt immer endständig in der Kohlenhydratkette auf.
- Sie ist enzymatisch bzw. hydrolytisch wesentlich leichter abspaltbar als die restlichen Monosaccharide.
- 15 - Während die neutrale Kohlenhydratkette in ihrer Struktur sehr konstant ist, treten beim Anteil der Sialinsäure große Schwankungen auf, die unter anderem von der Zellkultur und dem Aufreinigungsverfahren des Interferons abhängig sind.

20 Literatur:

Kagawa et al., J. Biol. Chem. 263 (1988), 17508-17515; EP-A-0 529 300.

Es wurde der Sialostatus (prozentualer Anteil einzelner Sialostrukturen) nach dreimonatiger Lagerung (Tabelle 9a) bzw. sechsmonatiger Lagerung (Tabelle  
25 9b) untersucht. Eine Kohlenhydratstruktur, die endständig keine Sialinsäure enthält, wird als Asialo bezeichnet. Eine Kohlenhydratstruktur, die endständig eine Sialinsäure enthält, wird als Monosialo bezeichnet. Eine Kohlenhydratstruktur, die endständig zwei Sialinsäuren enthält, wird als Disialo bezeichnet. Eine Kohlenhydratstruktur, die endständig drei Sialinsäu-  
30 ren enthält, wird als Trisialo bezeichnet.



- 30 -

Weiterhin wurde die Antennarität (prozentualer Anteil einzelner Verzweigungsarten) nach dreimonatiger Lagerung (Tabelle 10a) bzw. nach sechsmonatiger Lagerung (Tabelle 10b) bestimmt. Eine Kohlenhydratstruktur mit einer Verzweigung und damit zwei endständigen Galactosen wird als biantennär bezeichnet. Sie kann terminal mit null bis zwei Sialinsäuren besetzt sein. Eine Kohlenhydratstruktur mit zwei Verzweigungen und damit drei endständigen Galactosen wird als triantennär bezeichnet. Sie kann terminal mit null bis drei Sialinsäuren besetzt sein.

Außerdem wurde der Sialylierungsgrad (prozentuale Belegung terminaler Galactosereste mit Sialinsäure) nach dreimonatiger Lagerung (Tabelle 11a) bzw. nach sechsmonatiger Lagerung (Tabelle 11b) untersucht.

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, daß durch die Lagerung bei pH 5 eine geringe, aber reproduzierbare Desialylierung stattfindet. Eine Lagerung bei pH 7 beeinflußt den Sialylierungsgrad nicht.

Der in den Ansätzen 15 und 16 angegebene afuco-Anteil stammt vermutlich von Fremdproteinen aus dem zugesetzten Humanserumalbumin, die durch die Anti- $\beta$ -Chromatographie nicht quantitativ abgetrennt wurden.

Bezüglich der Antennarität erfolgt kein meßbarer Einfluß durch die Flüssiglagerung.

Tabelle 9a

Bezeichnung	Asialo	Monoasialo	Disialo	Trisialo
to-Wert	< 3	13,4	73,4	12,1
Formulierung 11	< 3	14,0	74,1	11,9
Formulierung 12	< 3	12,6	74,9	11,6
Formulierung 13	< 3	16,5	70,4	12,0
Formulierung 14	< 3	16,6	71,1	11,1
Formulierung 15	< 3	15,8	70,0	13,0
Formulierung 16	< 3	15,1	72,0	11,9

Tabelle 9b

Bezeichnung	Asialo	Monosialo	Disialo	Trisialo
to-Wert	< 3	13,4	73,4	12,1
Formulierung 10	< 3	13,9	70,2	15,3
Formulierung 11	< 3	14,5	73,9	11,6
Formulierung 12	< 3	14,0	72,4	13,6
Formulierung 13	< 3	18,6	68,9	11,7
Formulierung 14	< 3	19,0	69,4	10,7
Formulierung 15	< 3	17,0	71,0	11,3
Formulierung 16	< 3	16,1	71,5	12,4

Tabelle 10a

Bezeichnung	Biantennär	Triantennär 1->6	Triantennär + 1 repeat
to-Wert	74,4	18,1	3,7
Formulierung 11	72,9	18,7	3,7
Formulierung 12	76,9	17,0	2,7
Formulierung 13	74,7	18,0	3,1
Formulierung 14	75,9	17,3	2,9
Formulierung 15	76,2 (inkl. 5% afuco)	18,0	3,3
Formulierung 16	76,9 (inkl. 5% afuco)	17,8	3,0

Tabelle 10b

Bezeichnung	Biantennär	Triantennär 1->6	Triantennär + 1 repeat
to-Wert	74,4	18,1	3,7
Formulierung 10	71,4	19,3	4,0
Formulierung 11	73,0	18,7	3,3
Formulierung 12	72,3	19,7	3,4
Formulierung 13	72,4	19,2	3,4
Formulierung 14	74,2	18,7	3,2
Formulierung 15	73,0	18,7	2,8
Formulierung 16	74,3 (inkl. 4% afuco)	19,7	3,2

Tabelle 11a

	Bezeichnung	Sialyierungsgrad
	to-Wert	88,3
5	Formulierung 11	87,0
	Formulierung 12	88,2
	Formulierung 13	85,8
	Formulierung 14	85,8
	Formulierung 15	86,6
10	Formulierung 16	86,9

Tabelle 11b

	Bezeichnung	Sialyierungsgrad
15	to-Wert	88,3
	Formulierung 10	87,5
	Formulierung 11	86,6
	Formulierung 12	87,7
	Formulierung 13	84,1
20	Formulierung 14	84,3
	Formulierung 15	85,7
	Formulierung 16	86,5

### Patentansprüche

1. Flüssige Formulierung, die humanes Interferon- $\beta$  als Wirkstoff in einer  
Konzentration bis zu 25 MU/ml und einen Puffer zur Einstellung eines  
pH-Werts von 5 bis 8 enthält, frei von Humanserumalbumin ist und  
eine Langzeitstabilität der biologischen Aktivität (in vitro) von  
mindestens 80% der Ausgangsaktivität nach Lagerung bei 25°C für  
3 Monate aufweist.
2. Flüssige Formulierung, die humanes Interferon- $\beta$  als Wirkstoff und  
einen Puffer zur Einstellung eines pH-Werts von 6 bis 7,2 enthält, frei  
von Humanserumalbumin ist und eine Langzeitstabilität der biologi-  
schen Aktivität (in vitro) von mindestens 80% der Ausgangsaktivität  
nach Lagerung bei 25°C für 3 Monate aufweist.
3. Flüssige Formulierung, die humanes Interferon- $\beta$  als Wirkstoff, einen  
Puffer zur Einstellung eines pH-Werts von 5 bis 8 und eine oder  
mehrere Aminosäuren enthält und eine Langzeitstabilität der biologi-  
schen Aktivität (in vitro) von mindestens 80% der Ausgangsaktivität  
nach Lagerung bei 25°C für 3 Monate aufweist.
4. Formulierung nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie ein glykosiliertes Interferon- $\beta$  enthält.
5. Formulierung nach Anspruch 2,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß das Interferon- $\beta$  aus CHO-Zellen stammt.

6. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 5,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie den Puffer in einer Konzentration von 10 mmol/l bis 1 mol/l  
enthält.
- 5 7. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 6,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie einen Puffer ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus  
Phosphat-, Citrat- und Acetatpuffern und Mischungen davon enthält.
- 10 8. Formulierung nach Anspruch 7,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie einen Phosphat/Citratpuffer enthält.
- 15 9. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 und 3 bis 8,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie einen pH-Wert zwischen 6 und 7,2 aufweist.
- 20 10. Formulierung nach Anspruch 3,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie frei von Humanserumalbumin ist.
- 25 11. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 10,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie abgesehen vom Wirkstoff frei von humanen oder tierischen  
Polypeptiden ist.
- 30 12. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 11,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie frei von oberflächenaktiven Verbindungen ist.

13. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 12,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie eine chemische Integrität nach Lagerung bei 25°C für 6  
Monate aufweist.
14. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 13,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie eine physikalische Integrität nach Lagerung bei 25°C für 6  
Monate aufweist.
15. Formulierung nach einem der Ansprüche 1, 2 und 4 bis 14,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie weiterhin eine oder mehrere Aminosäuren enthält.
16. Formulierung nach Anspruch 3 oder 15,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie Methionin enthält.
17. Formulierung nach Anspruch 16,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß das Methionin in einer Konzentration von 0,1 bis 4 mmol/l  
vorliegt.
18. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 17,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie weiterhin Hilfsstoffe zur Einstellung der Tonizität enthält.
19. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 18,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie weiterhin Verdickungsmittel zur Viskositätserhöhung enthält.

20. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 19,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie weiterhin physiologisch verträgliche Konservierungsmittel  
enthält.
21. Pharmazeutisches Präparat,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß es eine flüssige Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 20  
enthält.
22. Pharmazeutisches Präparat nach Anspruch 21 zur oralen, parentera-  
len oder ophthalmologischen Applikation.
23. Pharmazeutisches Präparat nach Anspruch 21 oder 22 mit Einzel-  
dosen von 1 bis 25 MU.
24. Verfahren zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparats nach  
einem der Ansprüche 21 bis 23,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man eine Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 20 und  
gegebenenfalls weitere galenisch notwendige Hilfsstoffe zubereitet  
und in eine geeignete Darreichungsform bringt.
25. Verfahren zur Verbesserung der Haltbarkeit einer flüssigen Formu-  
lierung, die humanes Interferon- $\beta$  als Wirkstoff und einen Puffer zur  
Einstellung eines pH-Werts von 5 bis 8 enthält,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man eine Formulierung ohne Humanserumalbumin oder/und mit  
einer oder mehreren Aminosäuren verwendet.



26. Verfahren nach Anspruch 25,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Verbesserung der Haltbarkeit eine Verbesserung der Langzeit-  
stabilität der biologischen Aktivität (in vitro), der chemischen  
Integrität oder/und der physikalischen Integrität umfaßt.

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

5

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Dr.Rentschler Biotechnologie GmbH
- (B) STRASSE: Erwin-Rentschler-Str. 21
- (C) ORT: Laupheim
- 10 (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-88471

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Flüssige Interferon-  
ß Formulierungen

15

## (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 14

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- 20 (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version  
#1.30 (EPA)

25

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
- 30 (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

35

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

## (viii) POSITION IM GENOM:

(B) KARTENPOSITION: 109-115

40

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys  
1 5

45

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- 50 (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

55

## (viii) POSITION IM GENOM:

(B) KARTENPOSITION: 100-105

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Thr Val Leu Glu Glu Lys  
1 5

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- 10 (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

15

(viii) POSITION IM GENOM:

(B) KARTENPOSITION: 46-52

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

20

Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

25

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- 30 (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(viii) POSITION IM GENOM:

35

(B) KARTENPOSITION: 116-123

(ix) MERKMAL:

- 40 (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site  
(B) LÄNGE: 2  
(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Xaa = Met(oxi-  
diert) "

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

45

Leu Xaa Ser Ser Leu His Leu Lys  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

50

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

55

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(viii) POSITION IM GENOM:

(B) KARTENPOSITION: 116-123

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 12 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(viii) POSITION IM GENOM:

(B) KARTENPOSITION: 34-45

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LÄNGE: 3

(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Xaa = Met (oxidiert)"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Asp Arg Xaa Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys  
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 11 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(viii) POSITION IM GENOM:

(B) KARTENPOSITION: 124-134

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys  
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 12 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(viii) POSITION IM GENOM:

(B) KARTENPOSITION: 34-45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys  
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(viii) POSITION IM GENOM:

(B) KARTENPOSITION: 20-33

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys  
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 19 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(viii) POSITION IM GENOM:

(B) KARTENPOSITION: 1-19

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:1

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "Xaa = Met(oxi-  
diert)"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Xaa Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln  
1 5 10 15

Cys Gln Lys

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 19 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

5

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(viii) POSITION IM GENOM:

(B) KARTENPOSITION: 1-19

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln  
1 5 10 15

15

Cys Gln Lys

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

20

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

25

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(viii) POSITION IM GENOM:

(B) KARTENPOSITION: 137-166

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg  
1 5 10 15

35

Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn  
20 25 30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

40

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 47 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

45

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(viii) POSITION IM GENOM:

(B) KARTENPOSITION: 53-99

50

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site
- (B) LÄNGE: 10

55

(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Xaa = Met(oxi-  
diert)"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

5	Glu 1	Asp	Ala	Ala	Leu 5	Thr	Ile	Tyr	Glu	Xaa 10	Leu	Gln	Asn	Ile	Phe 15	Ala
	Ile	Phe	Arg	Gln 20	Asp	Ser	Ser	Ser	Thr 25	Gly	Trp	Asn	Glu	Thr 30	Ile	Val
10	Glu	Asn	Leu 35	Leu	Ala	Asn	Val	Tyr 40	His	Gln	Ile	Asn	His 45	Leu	Lys	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

15 (A) LÄNGE: 47 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

20 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(viii) POSITION IM GENOM:  
(B) KARTENPOSITION: 53-99

25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

	Glu	Asp	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Tyr	Glu	Met	Leu	Gln	Asn	Ile	Phe	Ala
	1				5					10					15	
30	Ile	Phe	Arg	Gln	Asp	Ser	Ser	Ser	Thr	Gly	Trp	Asn	Glu	Thr	Ile	Val
				20					25					30		
	Glu	Asn	Leu	Leu	Ala	Asn	Val	Tyr	His	Gln	Ile	Asn	His	Leu	Lys	
35			35					40					45			

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 98/06065

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 A61K38/21 A61K9/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 98 28007 A (BIOGEN, INC.) 2 July 1998	1-15, 18, 20, 21, 23-26
Y	see page 3, line 23 - line 32; claims 1-9, 20, 23, 27-35, 41-43; examples 2, 4, 6, 7 see page 12, line 4 - line 8 see page 12, line 10 - page 13, line 7; table 1 see page 16, line 7 - line 12	16, 17, 19, 22
Y	US 5 358 708 A (S.T. PATEL) 25 October 1994 cited in the application see column 2, line 45 - line 57; example 1 see column 3, line 59 - line 66 --- -/--	16, 17

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 February 1999

Date of mailing of the international search report

19/02/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ryckebosch, A



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In International Application No  
PCT/EP 98/06065

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 529 300 A (BIOFERON BIOCHEMISCHE SUBSTANZEN GMBH & CO) 3 March 1993 cited in the application see claims 1,12,24-26,28; example 3 see page 6, line 6 - line 11 ---	19,22
A	EP 0 374 257 A (TORAY INDUSTRIES, INC.) 27 June 1990 see page 3, line 4 - line 18; claims 1-13 see page 5, line 15 - line 21 see page 14 -----	1-26

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/06065

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9828007 A	02-07-1998	AU 5619198 A	17-07-1998
US 5358708 A	25-10-1994	NONE	
EP 529300 A	03-03-1993	DE 4128319 A	04-03-1993
		AT 172206 T	15-10-1998
		DE 59209525 D	19-11-1998
		ES 2121804 T	16-12-1998
EP 374257 A	27-06-1990	DE 68917883 D	06-10-1994
		DE 68917883 T	23-02-1995
		AT 110571 T	15-09-1994
		WO 8910756 A	16-11-1989
		JP 2803271 B	24-09-1998



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06065

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 A61K38/21 A61K9/08

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO 98 28007 A (BIOGEN, INC.) 2. Juli 1998	1-15, 18, 20, 21, 23-26
Y	siehe Seite 3, Zeile 23 - Zeile 32; Ansprüche 1-9, 20, 23, 27-35, 41-43; Beispiele 2, 4, 6, 7 siehe Seite 12, Zeile 4 - Zeile 8 siehe Seite 12, Zeile 10 - Seite 13, Zeile 7; Tabelle 1 siehe Seite 16, Zeile 7 - Zeile 12 ---	16, 17, 19, 22
Y	US 5 358 708 A (S.T. PATEL) 25. Oktober 1994 in der Anmeldung erwähnt siehe Spalte 2, Zeile 45 - Zeile 57; Beispiel 1 siehe Spalte 3, Zeile 59 - Zeile 66 --- -/-	16, 17



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. Februar 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

19/02/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Ryckebosch, A

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06065

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 529 300 A (BIOFERON BIOCHEMISCHE SUBSTANZEN GMBH & CO) 3. März 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche 1,12,24-26,28; Beispiel 3 siehe Seite 6, Zeile 6 - Zeile 11 ---	19,22
A	EP 0 374 257 A (TORAY INDUSTRIES, INC.) 27. Juni 1990 siehe Seite 3, Zeile 4 - Zeile 18; Ansprüche 1-13 siehe Seite 5, Zeile 15 - Zeile 21 siehe Seite 14 -----	1-26

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

II Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06065

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9828007	A	02-07-1998	AU	5619198 A	17-07-1998
US 5358708	A	25-10-1994	KEINE		
EP 529300	A	03-03-1993	DE	4128319 A	04-03-1993
			AT	172206 T	15-10-1998
			DE	59209525 D	19-11-1998
			ES	2121804 T	16-12-1998
EP 374257	A	27-06-1990	DE	68917883 D	06-10-1994
			DE	68917883 T	23-02-1995
			AT	110571 T	15-09-1994
			WO	8910756 A	16-11-1989
			JP	2803271 B	24-09-1998